

Translation
attached

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-190774

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成4年(1992)7月9日

A 23 L 3/3544
C 07 D 311/28
311/62
C 09 K 15/08
C 11 B 5/00

6977-4B
6701-4C
6701-4C
6917-4H
2115-4H

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

④ 発明の名称 抗変異原性剤

⑦ 特 願 平2-317721

⑧ 出 願 平2(1990)11月26日

⑨ 発 明 者	杉 本	勝 俊	千葉県野田市野田339番地	キッコーマン株式会社内、
⑨ 発 明 者	有 賀	敏 明	千葉県野田市野田339番地	キッコーマン株式会社内
⑨ 発 明 者	大 下	克 典	千葉県野田市野田339番地	キッコーマン株式会社内
⑨ 発 明 者	菊 地	護	千葉県野田市野田339番地	キッコーマン株式会社内
⑩ 出 願 人	キッコーマン株式会社		千葉県野田市野田339番地	

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

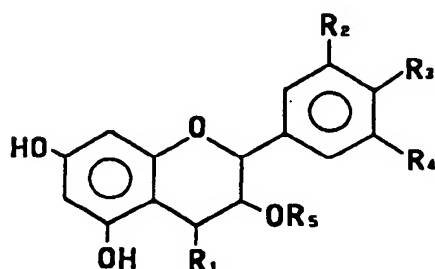
1. 発明の名称

抗変異原性剤

2. 特許請求の範囲

1 プロアントシアニンオリゴマーを有効成分とする抗変異原性剤。

2 プロアントシアニンオリゴマーが、一般式



(式中、R₁は水素又は水酸基、R₂、R₃、R₄は水素、水酸基又はメトキシ基、R₅は水素、

ガロイル基又はグリコピラノシル基である)

で表されるフラバン-3-オール又はフラバン-3,4-ジオールを構成単位として結合した2~10量体の群より選ばれた少なくとも1種である請求項1記載の抗変異原性剤。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は抗変異原性剤、特に食品中の変異原性物質を不活性化させる安全性の高い抗変異原性剤に関するものである。

[従来技術]

我々を取り巻く生活環境には多くの変異原性物質が存在している。そしてこの物質の変異原性は発癌性と高い相関関係があることが数多くの研究機関より報告されている。このことは、物質の変異原性を減少させることによって、ヒトの発癌のリスクを軽減させる効果が期待されることになる。

食品中に存在する変異原性物質として、焼け揚げ中のヘテロサイクリックアミン類、かび毒で知られているアフラトキシン類その他各種のものが

特開平4-190774 (2)

挙げられており、これらの中には変異原性が強く、発癌性が証明されているものも多い。

そこで従来、これらの変異原性物質を不活性化させる方法が種々研究されている。その一つとしてカテキンがベンゾ (a) ピレンに対して変異原性抑制作用を示すことが知られている。

〔発明が解決しようとする課題〕

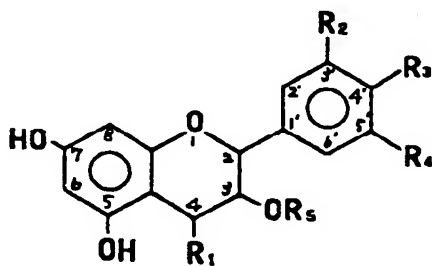
本発明は、変異原性物質を含有する食品中の変異原性を消滅させるか低減させて食品の安全性を向上させる抗変異原性剤を提供することを目的としてなされたものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、前記目的を達成すべく鋭意研究した結果、プロアントシアニジンオリゴマーが食品中の変異原性物質、殊に焼け焦げ中のヘテロサイクリックアミン類の代表例である Trp P-2 に対し強い変異原性抑制作用を示すことを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、プロアントシアニジンオリゴマーを有効成分とする抗変異原性剤である。

強い変異原性抑制作用を有している点に大きな特徴がある。そしてまた該変異原性抑制作用はその縮合度又は重合度が増す程強くなることも見出した。この観点及び溶解性などから、プロアントシアニジンオリゴマーとしては、一般式



(式中、 R_1 は水素又は水酸基、 R_2 、 R_3 、 R_4 は水素、水酸基又はメトキシル基、 R_5 は水素、ガロイル基又はグリコピラノシル基である)で表されるフラバン-3-オール又はフラバン-3,4-ジオールを構成単位として結合した 2 ~ 10 量体 (特開昭 61-16982 号参照) が好ましく、中

以下本発明について詳細に説明する。

先ず、本発明において、プロアントシアニジンオリゴマーとは、各種の植物体に存在する縮合型タンニン、すなわち、フラバン-3-オール又はフラバン-3,4-ジオールを構成単位として縮合若しくは重合により結合した化合物群であって、これらは酸処理によりシアニジン、デルフィニジン、ペラルゴニジンなどのアントシアニジンを生成するところから、この名称が与えられているものである。

従って、該プロアントシアニジンオリゴマーとしては、前記構成単位の 2 量体、3 量体、4 量体、さらには 10 量体以上の高分子のプロシアニジン、プロデルフィニジン、プロペラルゴニジンなどのプロアントシアニジンオリゴマー及びこれらの立体異性が全て含まれる。

そしてこれらのプロアントシアニジンオリゴマーは、その構成単位であり、かつ前記のごとくベンゾ (a) ピレンに対する変異原性抑制作用が知られている単量体カテキンとは異なって、極めて

でも 2~6 量体がヒトにおける吸収性の観点から特に好適である。

なお、本発明において用いられるプロアントシアニジンオリゴマーは変異原性を有していないこと勿論である [フード・アンド・ケミカル・トキシコロジー (Fd.Chem.Toxic.) 第 25 巻、135 頁 (1987 年)]。

該プロアントシアニジンオリゴマーは各種変異原性物質に対して変異原性抑制作用を有しているが、その 1 つである Trp P-2 に対して殊に強い変異原性抑制効果を有している。すなわち、該プロアントシアニジンオリゴマーは、Trp P-2 などの変異原性物質を含有する食品に対して極めて有効に用いられる。

その食品としては、例えば焼魚、ハンバーグ、焼肉などの加熱食品などが挙げられる。

勿論、本発明はその他の変異原性物質を含有する食品にも適用され得る。

次に、プロアントシアニジンオリゴマーの添加量は特に限定されないが、通常変異原性物質の

特開平4-190774 (3)

20~20000 倍モル、好ましくは 200~2000 倍モルである。そして、食品に対する該添加量を概略的にいうと、食品中の変異原性物質含量などにより異なるが、一般的には $1 \times 10^{-3} \sim 10\%$ (W/W)、好ましくは $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-1}\%$ (W/W) ある。

そしてまた、プロアントシアニジンオリゴマーは、通常粉末あるいは溶液の状態でそのまま又は可食性のもの（例えばグルコース、デキストリンなど）を加えて抗変異原性剤とし、これを食品に添加混合して使用される。さらには、加熱食品に用いる例えばたれなどの調味料に該抗変異原性剤を添加使用することもできる。

また、該抗変異原性剤を用いることによる食品の香味への影響は全くない。

ここで、本発明に用いるプロアントシアニジンオリゴマーにつき、さらに具体的に示す。

前記一般式で表されるフラバン-3-オール又はフラバン-3,4-ジオールを構成単位として結合した 2 ~ 10 量体などのプロアントシアニジ

ンオリゴマーは、公知方法すなわち合成法あるいは各種植物体よりの抽出などにより得ることができる。後者の場合についていうと、例えば各種の植物体を溶媒を用いて抽出処理し、得た抽出物をさらに液体クロマトグラフィーなどにより分別精製するか、あるいは植物体を原料とした果実酒、ビールなどの二次加工品をプロアントシアニジンオリゴマーの選択的吸着剤で処理して該プロアントシアニジンオリゴマー区分を濃縮し、濃縮物をさらに向流分配法、液体クロマトグラフィーなどにより分別精製することによって得られる。

そして各種プロアントシアニジンオリゴマー及びその製法を例示すると次の通りである。

(1) 2 量体プロシアニジン B-2 (C₆-C₆ 結合 Catechin-Catechin)、C₆-C₆ 結合の 2 量体プロシアニジン (C₆-C₆ 結合 Catechin-Afzelechin) : 本発明者らの一部のアグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol.Chem.) 第 45 巻、2709~2712 頁 (1981 年) 記載の方法で、アズキ (*Vigna angularis* Ohwi

et Ohashi) の 70% 水性アセトン抽出物をポリアミド C-200 及びセファデックス LH-20 のカラムを用いた液体クロマトグラフィーにより分別精製することにより得られる。

(2) 2 量体プロアントシアニジン A-2 : D. Jacques らのジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイティー・パーキン I (J.C.S. Perkin I) 2663~2671 頁 (1974 年) 記載の方法でトチ (*Aesculus hippocastanum*) の実の殻を原料として得られる。

(3) C₆-C₆ 結合の 2 量体プロシアニジン (C₆-C₆ 結合 Catechin-Catechin) : R.W. Hemingway らのフィトケミストリー (Phytochemistry) 第 22 巻、275~281 頁 (1983 年) 記載の方法でマツ (*Lobololly pine*) の樹皮を原料として得られる。

(4) C₆-C₆ 結合の 2 量体プロデルフィニジン (C₆-C₆ 結合 Gallocatechin-Catechin) : Byung-Zun Ahn らのアーカイブ・デル・ファーマシー・ウント・ペリヒテ・デル・ドイチュン・ファーマゾイティシェン・ゲゼルシャフト (Arch. Pharmaz.) 666~673 頁 (1970 年) 記載の方法

でカシ (Oak) の樹皮を原料として得られる。

(5) プロシアニジン B-1 一没食子酸エステル (C₆-C₆ 結合 Catechin gallate-Catechin)、プロシアニジン B-1 二没食子酸エステル (C₆-C₆ 結合 Catechin gallate-Catechin gallate) : 野中らのフィトケミストリー (Phytochemistry) 第 21 巻、429~432 頁 (1982 年) 記載の方法でミチヤナギ (*Polygonum multiflorum*) の根を原料として得られる。

(6) 2 量体プロデルフィニジン B-2 二没食子酸エステル (C₆-C₆ 結合 Gallocatechin gallate-Galocatechin gallate) : 野中らのフィトケミストリー (Phytochemistry) 第 22 巻、237~241 頁 (1983 年) 記載の方法でヤマモモ (*Myricarubra*) の樹皮を原料として得られる。

(7) C₆-C₆ 結合の 2 量体プロベラルゴニジン (C₆-C₆ 結合 Afzelechin-Catechin)、C₆-C₆ 結合の 3 量体プロデルフィニジン (C₆-C₆ 結合 Gallocatechin-Galocatechin-Catechin) : I. Mcmurrough らのジャーナル・オブ・サイエ

特開平4-190774 (4)

ンス・オブ・フード・アグリカルチャー (J. Sci. Food Agric.) 第 34 巻、62~72 頁(1983 年) 記載の方法により大豆及び麦芽を原料として得られる。

(8) 2 量体プロシアニジン B-4 ラムノサイド: メヒルギの皮部を原料として特開昭 59-59638 号記載の方法で得られる。

(9) C₁-C₂ 結合の 2 量体プロベラルゴニジン [C₁-C₂ 結合 Afzelchin-Gallicocatechin(4'-O-methyl)]: F.D. Monache らのアナリ・デイ・キミカ [Ann. Chim. (Rome)] 第 57 巻、1364~1371 頁(1967 年) 記載の方法によりオウラテイ (Ouratea) の根の皮を原料として得られる。

(10) C₁-C₂ 結合の 4 量体プロシアニジン (C₁-C₂ 結合 Catechin-Catechin-Catechin-Catechin): A.G.H. Lea のジャーナル・オブ・サイエンス・オブ・フード・アグリカルチャー (J. Sci. Food Agric.) 第 29 巻、471~477 頁(1978 年) 記載の方法で、リンゴ酒をセファデックス LH-20 で処理して得られるプロアントシアニジ

ンの産物物を、酢酸エチル及び水を用いた向流分配法並びにセファデックス LH-20 のカラムを用いた液体クロマトグラフィーにより分別精製することによって得られる。

(11) 2 量体プロシアニジン B-3 (C₁-C₂ 結合 Catechin-Catechin)、2 量体プロシアニジン B-4 (C₁-C₂ 結合 Catechin-Catechin): G. Fonknechten らのジャーナル・オブ・インスティテュート・ブルーイング (J. Inst. Brew.) 第 89 巻、424~431 頁(1983 年) 記載の方法により、ジヒドロクエルセチン及びカテキン又はエビカテキンを原料として合成法で得られる。また、R. Eastmond のジャーナル・オブ・インスティテュート・ブルーイング (J. Inst. Brew.) 第 80 巻、188 頁(1974 年) 記載の合成法によっても得られる。

以下に実施例を示す。

なお実施例において、変異原性及び変異原性抑制作用の測定方法は、ブレインキューベーション法 [発癌性スクリーニング手法として確立されたエ

ームス法の改良法 (杉村、長尾; ケミカルミュタジェンス、第 6 巻、41 頁(1981 年) 参照) により行ない、また、菌株としてヒスチジン要求性のサルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) TA98 (以下 TA98 株という) を使用した。そしてまた、

$$\text{変異原性抑制率 (Y\%)} = 1 - \frac{A - C}{B - C} \times 100$$

A: 抗変異原性剤添加プレートのコロニー数/プレート

B: 抗変異原性剤無添加プレートのコロニー数/プレート [但し、表においては、添加量 0 (無添加) の行に相当]

C: 自然復帰コロニー数/プレート

(A - C) 及び (B - C): 復帰突然変異コロニー数/プレート

とした。

実施例

I. Trp P-2 (3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド [4, 3-b] インドール) に対するカテキン、ブ

ロアントシアニジンオリゴマーの変異原性抑制作用

変異原性物質 Trp P-2 0.066 % (W/V) 含有水溶液 50 μ l (該物質 33 ng 含有) に、第 1 表に示す添加量のカテキン (市販品)、プロアントシアニジンオリゴマーの 1 つである 2 量体プロシアニジン B-4 (表において 2 量体 PC という) 及び C₁-C₂ 結合の 4 量体プロシアニジン (表において 4 量体 PC という) (下記製法により得たもの) の各試料 50 μ l、S-9 mix 500 μ l 及び TA98 株の前培養液 100 μ l を加えた。この混合液を直ちに 37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキューベーションし、次いでこれに 0.5 mM のヒスチジン及び 0.5 mM のビオチンを含む炊寒天液 2 ml を加え、最少グルコース寒天培地に移植した。そして 37 $^{\circ}$ C で 48 時間静置培養後、プレートのコロニー数を数えた。その結果を第 1 表に示す。

プロアントシアニジンオリゴマーの製法:

(1) 2 量体プロシアニジン B-3 (C₁-C₂ 結合 Catechin-Catechin):

特開平4-190774 (5)

前記 R. Eastmond の方法に準じ、(±)ジヒドロケルセチン 5 g、(+)-カテキン 5 g 及び水素化ホウ素ナトリウムを原料として合成反応を行った。反応終了後、酢酸にて pH 5.0 に調整し、酢酸エチルにて抽出した。得た抽出液を減圧蒸留し、これを、セファデックス LH (φ2.5×67 cm) を担体とし、エタノールを展開溶媒とするカラムクロマトグラフィーにて分画し、溶出液量 900~1300 ml の画分を分取することにより、粗プロシアニジン B-3 を得た。この画分をさらに逆相系シリカゲル高速液体クロマトグラフィー (カラム μ Bondapak C₁₈ [19×150 mm] ; 展開溶媒 7.5 % メタノール ; 検出 OD 500nm) にて精製し、目的物 501 mg を得た。

(2) C₄-C₆ 結合の 4 量体プロシアニジン (C₄-C₆ 結合 Catechin-Catechin-Catechin-Catechin) ;

白ぶどう (品種 シャルドネ) 搾汁粕を篩で分別して得た白ぶどう種子 1 kg に対し、水 2 l を加え、85 °C で 2 時間抽出した。固液分離し

て得られた抽出液をポリスチレン系樹脂 SP 207 (三菱化成製) カラム (φ1.8×50 cm) にて濾過し、ポリフェノールをカラムに吸着させた。このカラムを水 1.5 l、15 % エタノール 1.5 l にて洗浄後、30 % エタノール 1.5 l にて溶出した。この溶出液を、減圧蒸留した後、凍結乾燥し、粗プロアントシアニジンオリゴマー 20.4 g (プロアントシアニジンオリゴマー 2~6 量体含有量 51 %) を得た。この粉末の 2 g を取り、セファデックス LH-20 (φ2.5×66 cm) を担体とし、エタノール 2600 ml 及びメタノール 2600 ml を展開溶媒 (2段階溶出) とし、紫外部 (OD 500nm) で検出するカラムクロマトグラフィーを行なった。この溶出液のうち、3200~3400 ml の画分を分取し、前記 A.G.H. Lea の方法に準じて、目的物 157 mg を得た。

S-9 mix : 下記 S-9 10 μl と cofactor mix 490 μl の混合物

S-9 [キッコーマン (株) 製] : 7 週令の SD ラットの雄に誘導剤としてフェノバルビタール及

び 5, 6-ベンゾフラボンを腹腔内投与して癌物代謝酵素系を誘導したラット肝臓ホモジネートの遠心処理 (9000×g, 10 分間) 上清

cofactor mix [オリエンタル酵母工業 (株) 製 商品名] : ニコチンアミドジヌクレオチド (NADH)、ニコチンアミドジヌクレオチドリリン酸 (NADPH)、グルコース-6-リン酸 (G6P) などの補酵素、マグネシウムイオン (Mg²⁺) などを加えたもの。

第 1 表

添加量 (mg/ プレート)	カテキン	2 量体 PC	4 量体 PC
	A (Y %)	A (Y %)	A (Y %)
0	4000 (0)	4000 (0)	4000 (0)
125	4000 (0)	3200 (20)	274 (94)
250	2400 (40)	2000 (50)	109 (98)
500	1508 (63)	1205 (70)	106 (98)

※自然獲得コロニー数/プレート : 23

第 1 表から、プロアントシアニジンオリゴマーの Trp P-2 に対するラット肝臓ホモジネート存在下での変異原性抑制率 (抗変異原性) は、顯著に

認められ、カテキンに比しても極めて高いことがわかる。

II. 活性化 Trp P-2 に対するカテキン、プロアントシアニジンオリゴマーの変異原性抑制作用

下記早津らの方法によって調製した活性化 Trp P-2 50 μ l に、第 2 表に示す添加量の前記 I. と同様のカテキン、プロアントシアニジンオリゴマーの各試料 50 μ l、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 500 μ l 及び TA98 株の前培養液 100 μ l を加えた。この混合液を直ちに 37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベーションし、次いでこれに 0.5 mM のヒスチジン及び 0.5 mM のビオチンを含む軟寒天液 2 ml を加え、最少グルコース寒天培地に植えた。そして 37 $^{\circ}$ C で 48 時間静置培養後、プレートのコロニー数を数えた。この結果を第 2 表に示す。

活性化 Trp P-2 の調製 [早津らの方法: バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys.

Res. Commun.) 第 92 巻、662-668 頁 (1980 年)] : Trp P-2 50 μ l に前記 S-9 mix 500 μ l を加え、この混合液を直ちに 37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベーションした。次いでこれに当量のアセトンを加えて水冷し、15 分後、3000 rpm で 10 分間遠心処理し、得た上清を減圧乾燥し、滅菌水 50 μ l を加えて活性化 Trp P-2 を調製した。

第 2 表

添加量 (mg/ 7 プレート)	カテキン	2 量体 PC	4 量体 PC
	A (Y%)	A (Y%)	A (Y%)
0	1373 (0)	1373 (0)	1373 (0)
125	610 (57)	305 (79)	204 (87)
250	377 (75)	77 (96)	69 (97)
500	53 (98)	49 (98)	46 (98)

※自然復帰コロニー数/プレート: 22

第 2 表から、プロアントシアニジンオリゴマーの活性化された Trp P-2 に対する変異原性抑制率も亦、顕著に認められ、カテキンに比しても極

めて高いことがわかる。

以上のことからプロアントシアニジンオリゴマーは、抗変異原性剤として極めて優れていること、そしてしかも、従来ベンゾ(a)ピレンに対する変異原性抑制作用が知られているカテキンに比し、その作用が著しく強いことがわかる。

特許出願人 キッコーマン株式会社

[19] Japanese Patent Office (JP)

[11] Japanese Patent Application Kokai Publication No. Hei 4-190774

[12] Official Gazette for Kokai Patent Applications (A)

[15] Int. Cl. ⁵	Identification No.	JPO File No.
A23L 3/3544		6977-4B
C07D 311/28		6701-4C
	311/62	601-4C
C09K 15/08		6917-4H
C11B 5/00		2115-4H

[43] Kokai Publication Date: July 9, 1992

Request for Examination: Not Filed

Number of Claims: 2 (6 pages total)

[54] Title of the Invention: AN ANTIMUTAGENIC AGENT

[21] Application No. Hei 2-317721

[22] Filing Date: November 26, 1990

[72] Inventor: Masatoshi SUGIMOTO, c/o Kikkoman Corp., No. 339 Noda, Noda-shi, Chiba-ken

[72] Inventor: Toshiaki ARIGA, c/o Kikkoman Corp., No. 339 Noda, Noda-shi, Chiba-ken

[72] Inventor: Katsunori OOSHITA, c/o Kikkoman Corp., No. 339 Noda, Noda-shi, Chiba-ken

[72] Inventor: Mamoru KIKUCHI, c/o Kikkoman Corp., No. 339 Noda, Noda-shi, Chiba-ken

[71] Applicant: Kikkoman Corp., No. 339 Noda, Noda-shi, Chiba-ken

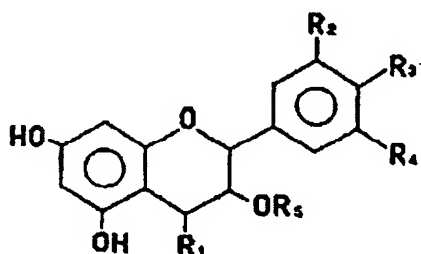
Specification

1. Title of the Invention

An Antimutagenic Agent

2. Claims

1. An antimutagenic agent having a proanthocyanidin oligomer as an active ingredient.
2. An antimutagenic agent according to claim 1, wherein the proanthocyanidin oligomer is at least 1 substance selected from among the group consisting of dimers through decamers in which flavan-3-ols or flavan-3,4-diols represented by the following general formula:



(where R_1 is hydrogen or a hydroxyl group, R_2 , R_3 , and R_4 are hydrogen, a hydroxyl group, or methoxyl group, and R_5 is hydrogen, a galloyl group, or a glycopyranosyl group)

are bonded as structural units.

3. Detailed Description of the Invention

(Industrial Field of Application)

The present invention relates to an antimutagenic agent, in particular, a highly stable antimutagenic agent that deactivates mutagenic substances in food products.

(Prior Art)

Numerous mutagenic substances exist in the living environment that surrounds us. Furthermore, it has been reported by numerous research institutions that the mutagenicity of these substances has a strong correlation with carcinogenicity. This indicates that a reduction in cancer risk in humans can be effected by reducing the mutagenicity of these substances.

Mutanogenic substances existing in foods include the heterocyclic amines in charred

materials, aflatoxins known as mold toxins, and other types of materials, and among these are many which have strong mutagenicity and have been proven to have carcinogenic properties.

In the past, various studies have been performed concerning methods of deactivating these mutagenic substances. One such study has shown the mutagenicity inhibiting action of catechins on benzo[a]pyrene.

(Problems that the Invention is to Solve)

The present invention has the object of offering an antimutagenic agent that is able to increase the safety of foods by eliminating or reducing the mutagenicity in food products containing mutagenic substances.

(Means Used to Solve the Problems)

In the present invention, as the result of intensive studies aimed at achieving the aforesaid purpose, it was found that proanthocyanidin oligomers exhibit a strong mutagenicity inhibiting action on mutagenic substances in foods, particularly Trp P-2, which is a representative example of tetracyclic amines in scorched foods, and based on these findings achieved the present invention.

Specifically, the present invention is an antimutagenic agent having proanthocyanidin oligomers as its effective ingredient.

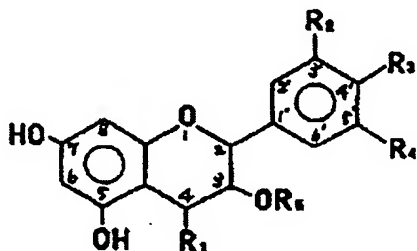
The present invention is explained below in further detail.

First, in the present invention, the term "proanthocyanidin oligomers" refers to condensed type tannins present in various plant matter, specifically, the compound group formed by the bonding of flavan-3-ol or flavan-3,4-diol as structural units by condensation or polymerization and given this name because they produce cyanidin, delphinidin, peralgonidin, etc., when treated with an acid.

Accordingly, proanthocyanidin oligomers such as polymeric procyanidin, prodelfinidin, and properalgonidin, which are dimers, trimers, tetramers, or even decamers or above of the aforesaid structural units, and stearic isomers thereof are all included among said proanthocyanidin oligomers.

Additionally, these proanthocyanidin oligomers, unlike monomeric catechins that are their structural unit, are known to have a mutagenicity inhibiting action with regard to benzo[a]pyrene

as described above, and have as their major characteristic the fact that they possess extremely strong mutagenicity inhibiting action. Moreover, it has been discovered that said mutagenicity inhibiting action becomes stronger the more the degree of condensation or degree of polymerization is increased. From this fact, and in terms of solubility, etc., dimers through decamers, in which flavan-3-ols or flavan-3,4-diols represented by the following general formula:



(where R_1 is hydrogen or a hydroxyl group, R_2 , R_3 , and R_4 are hydrogen, a hydroxyl group, or methoxyl group, and R_5 is hydrogen, a galloyl group, or a glycopyranosyl group) are bonded as structural units (see Japanese Unexamined Patent Application Kokai No. Sho 61-16982) are desirable, and among these, dimers through hexamers are especially desirable from the standpoint of absorptivity in the human body.

Of course, the proanthocyanidin oligomers used in the present invention do not themselves have any mutagenicity [*Food and Chemical Toxicology (Fd. Chem. Toxic.)*, Vol. 25, p. 135 (1987)]

Said proanthocyanidin oligomers have a mutagenicity inhibiting action on various mutagenic substances, but have especially strong mutagenicity inhibiting efficacy with regard to Trp P-2, one of these mutagenic substances. Specifically, said proanthocyanidin oligomers can be used very effectively in food products containing mutagenic substances such as Trp P-2.

Examples of such food products include heated foods such as broiled fish, hamburgers, Korean-style barbecued meat, etc.

Of course, the present invention can also be used in food products containing other mutagenic substances.

Next, the additive amount of proanthocyanidin oligomers is not subject to any particular restrictions, and normally is in a range of 20 to 20,000 times, preferably 200 to 2000 times, the

molar equivalent of the mutagenic substance. Said additive amount in relation to the food product roughly varies according to the quantity of mutagenic substance in the food product, etc., but generally is in a range of 1×10^{-5} to 10% (W/W), preferably 1×10^{-3} to 1×10^{-1} % (W/W).

Furthermore, the proanthocyanidin oligomers can be used as they are in the form of a powder or liquid, or can be added to an edible substance (such as glucose, dextrin, etc.) and used as an antimutagenic agent, which is added to and blended with the food product. Moreover, said antimutagenic agent can be added to seasonings such as sauces, for example, that are used on heated food products.

There is absolutely no effect on the taste of the foods resulting from the use of said antimutagenic agent.

Here, the proanthocyanidin oligomers used in the present invention are described in detail.

Dimeric through decameric, etc., proanthocyanidin oligomers in which flavan-3-ols or flavan-3,4-diols represented by the aforesaid general formula are bonded as structural units can be obtained by conventional methods, specifically, synthesis processes or extraction from various types of plant matter. Referring to the latter case, for example, various types of plant matter may be subjected to an extraction process using a solvent, and the extract obtained separately refined by means of liquid chromatography, etc. Alternatively, a secondary processed product such as fruit juice, liquor or beer having a plant source material is treated with a selective attractant for proanthocyanidin oligomers, said proanthocyanidin oligomer fraction is condensed, and the condensate is separated and refined by means of a directional flow distribution method, liquid chromatography, etc.

Various types of proanthocyanidin oligomers and their manufacturing methods are cited below.

(1) Dimeric proanthocyanidin B-2 (C_4-C_8 bonded catechin-catechin), C_4-C_8 bonded dimeric procyanidin (C_4-C_8 bonded catechin-afzelechin): using a method of a portion of the present inventors specified in *Agricultural Biological Chemistry (Agric. Biol. Chem.)*, Vol. 45, pp. 2709-2712 (1981), a 70% aqueous acetone extract of adzuki beans (*Vigna angularis ohwiet ohashi*), is separated and refined by means of liquid chromatography using a column of polyamide C-200 and Sephadex LH-20, and the product is obtained thereby.

(2) Dimeric proanthocyanidin A-2: obtained using the shells of the seed of the horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by the method specified by D. Jacques, et al., in the *Journal of Chemical Society Perkin I (J.C.S. Perkin I)* pp. 2663-2671 (1974).

(3) C₄-C₈ bonded dimeric procyanidin (C₄-C₈ bonded catechin-catechin): obtained using the bark of the pine (Lobololly pine) by the method specified by R.W. Hemingway, et al., in *Phytochemistry*, Vol. 22, pp. 275-281 (1983).

(4) C₆-C₈ bonded dimeric prodelfinidin (C₆-C₈ bonded gallo catechin-catechin): obtained using bark of the oak as the raw material by the method specified by Byung-Zun Ahn, et al., in *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (Arch. Pharmaz.)*, pp. 666-673 (1970).

(5) Procyanidin B-1-gallate (C₄-C₈ bonded catechin gallate-catechin), procyanidin B-1 digallate (C₄-C₈ bonded catechin gallate-catechin gallate): obtained using the roots of knotgrass [Japanese: *michiyanagi*] (*Polygonum multiflorum*) by the method of Nonaka, et al., in *Phytochemistry*, Vol. 21, pp. 429-432 (1982).

(6) Dimeric prodelfinidin B-2 digallate (C₄-C₈ bonded gallo catechin gallate-gallo catechin gallate): obtained using the bark of the myrica [Japanese: *yamamomo*] (*Myracarubra*) by the method specified by Nonaka, et al., in *Phytochemistry*, Vol. 22, pp. 237-241 (1983).

(7) C₄-C₈ bonded dimeric peralgonidin (C₄-C₈ bonded afzelechin-catechin), C₄-C₈ bonded trimeric prodelfinidin (C₄-C₈ bonded gallo catechin-gallo catechin-catechin): obtained using as raw materials barley and barley sprouts in accordance with the method specified by I. McMurrough, et al., in the *Journal of Science of Food Agriculture (J. Sci. Food Agric.)*, Vol. 34, pp. 62-72 (1983).

(8) Dimeric procyanidin B-4 rhamnoside: obtained by the method specified in Japanese Unexamined Patent Publication Kokai Sho 59-59638, using the *mehirugi* [*Kandelia Rheedii*].

(9) C₄-C₈ bonded dimeric properalgonidin [C₄-C₈ bonded afzelechin-gallo catechin (4'-O-methyl)]: obtained using the skin of Ouratea roots in accordance with the method specified by F.D. Monache, et al., in *Annali de Chimica [Ann. Chim. (Rome)]*, Vol. 57, pp. 1364-1371 (1967).

(10) C₄-C₈ bonded tetrameric procyanidin (C₄-C₈ bonded catechin-catechin-catechin-catechin): obtained in accordance with the method specified by A.G.H. Lea in the *Journal of*

Science of Food Agriculture (J. Sci. Food Agric.), Vol. 29, pp. 471-477 (1978), by separation and purification of a condensate of proanthocyanidin obtained by treating fermented apple cider with Sephadex LH-20, by means of a directional flow distribution method using ethyl acetate and water and liquid chromatography using a column of LH-20.

(11) Dimeric procyanidin B-3 (C₄-C₈ bonded catechin-catechin), dimeric procyanidin B-4 (C₄-C₈ bonded catechin-catechin): obtained by means of a synthesis process using dihydroquercetin and catechin or epicatechin in accordance with the method specified by G. Fonknechten, et al., in *Journal of Institute Brewing (J. Inst. Brew.)*, Vol. 89, pp. 224-231 (1983). Also obtained by the synthesis method specified by R. Eastmond in the *Journal of Institute Brewing (J. Inst. Brew.)*, Vol. 80, p. 188 (1974).

Working examples are described below.

In the working examples, as the method of measuring mutagenicity and the mutagenicity inhibiting action, a preincubation method [modified version of the Ames method established as a carcinogenicity screening process, see Suginama, Nagao: *Chemical Mutagens*, Vol. 6, p. 41 (1981)], and *Salmonella typhimurium*, strain TA98 (hereinafter referred to as strain TA98), which has histidine-demanding properties, was used as the bacterial strain. The following formula was also used:

$$\text{Mutagenicity inhibition ratio (Y\%)} = 1 - [(A-C)/(B-C)] \times 100$$

A: colony number/plate on antimutagenic agent-added plate

B: colony number/plate on antimutagenic agent non-added plate [corresponding in the table to the row added amount 0 (not added)]

C: natural reversion colony number/plate

(A-C) and (B-C): reverse mutation colony number/plate

Working Example

I. Mutagenicity inhibiting action of catechin and proanthocyanidin oligomer on Trp P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b],indol)

Catechin (commercially sold product) in the amount shown in Table 1, 50 μl each of samples of dimeric procyanidin B-4 (referred to as dimeric PC in the table), which is one proanthocyanidin oligomer, and tetrameric procyanidin (referred to as tetrameric PC in the table) having $\text{C}_4\text{-C}_8$ bonds (obtained by the following method of production), together with 500 μl of S-9 mix and 100 μl of a preculture solution of strain TA98, were added to 50 μl of an aqueous solution containing 0.066% (W/V) of the mutagenic substance Trp P-2. This mixed liquid was immediately incubated for 20 min at 37°C, next 2 ml of agar containing 0.5 mM histidine and 0.5 mM biotin was added thereto, and the blend was spread on a small amount of glucose agar medium. Then, after still culturing for 48 hrs at 37°C, the number of colonies on the plate were counted. The results are shown in Table 1.

Method of producing proanthocyanidin oligomers:

(1) Dimeric proanthocyanidin B-3 ($\text{C}_4\text{-C}_8$ bonded catechin-catechin):

In accordance with the method of R. Eastmond described above, a synthesis reaction was performed using 5 g (\pm) dihydroquercetin, 5 g (+)-catechin, and sodium borohydride as source materials. After the reaction was completed, the pH was adjusted to 5.0 with acetic acid, and extraction was performed with ethylacetate. The liquid extract obtained was vacuum-distilled, this was fractionated using Sephadex LH (diameter 2.5 \times 67 cm) as a carrier in column chromatography using ethanol as a developing solvent. Coarse procyanidin B-3 was obtained by separating a fraction of the elution liquid in the amount of 900 to 1300 ml. This fraction was further refined using reverse-phase type silica gel high-speed liquid chromatography (column μ Bondapak C_{18} [19 \times 150 mm]; developing solvent 7.5% methanol; detection $\text{OD}_{280\text{ nm}}$) and 507 mg of the target substance was obtained.

(2) $\text{C}_4\text{-C}_8$ bonded tetrameric procyanidin ($\text{C}_4\text{-C}_8$ bonded catechin-catechin-catechin-catechin):

2 l of water was added to 1 kg of white grape seeds obtained by separating white grape (variety: Chardonnay) pressed lees with a sieve, and extraction was performed for 2 hrs at 85°C. The liquid extract obtained by solid-liquid separation was filtered with a polyester based resin SP207 (manufactured by Mitsubishi Chemical Corp.) column (diameter 1.8 \times 50 cm), and polyphenol was adsorbed in the column. This column was washed with 1.5 l of water and 1.5 l

of 15% ethanol, and then eluted with 1.5 l of 30% ethanol. The eluted liquid was vacuum-condensed, then freeze-dried, and 20.4 g of coarse proanthocyanidin oligomer (proanthocyanidin oligomer dimer-hexamer content 51%) was obtained. Using 2 g of this powder, Sephadex LH-20 (diameter 2.5 × 66 cm), using 2600 ml ethanol and 2600 l methanol as development solvents (2 stage elution), and column chromatography was performed with detection in the ultraviolet range (OD_{240 nm}). 3200 to 3400 ml of the fraction were extracted from this elution liquid, and 150 mg of target substance obtained in accordance with the aforesaid method of A.G.H. Lee.

S-9 mix: A blend of 10 µl of the following S-9 and 490 µl of cofactor mix.

S-9 [manufactured by Kikkoman Corp.]: The centrifugally processed (9000 × g, 10 min) supernatant of rat liver homogenates derived from drug metabolizing enzymes when phenobarbital and 5,6-benzoflavone were administered in the abdominal cavity of 7 week old male SD rats as an inducer.

Cofactor mix [commercial product name, manufactured by Oriental Yeast Co., Ltd.]: nicotinamide dinucleotide (NADH), nicotinamide dinucleotide phosphoric acid (NADH), glucose-6-phosphoric acid (G6P) enzymes, etc., and magnesium ions (Mg³⁺), etc., were added.

Table 1

Additive amount (mg/plate)	Catechin	Dimeric PC	Tetrameric PC
	A (Y%)	A (Y%)	A (Y%)
0	4000 (0)	4000 (0)	4000 (0)
125	4000 (0)	3200 (20)	274 (94)
250	2400 (40)	2000 (50)	109 (98)
500	1508 (63)	1205 (70)	106 (98)

*Natural reversion colony number/plate: 23

From Table 1 it can be seen that the mutagenicity in inhibition ratio (antimutagenicity) of

proanthocyanidin oligomers with regard to Trp P-2 in the presence of the rat liver homogenate is clearly manifested and is much higher than that of catechin.

II. Mutagenicity inhibiting activity of catechin and proanthocyanidin oligomers with regard to activated Trp P-2.

The aforesaid I in additive amounts shown in Table 2, 50 μ l of samples of catechin and proanthocyanidin oligomer, 500 μ l of 100 mM sodium phosphate buffer solution, and 100 μ l of strain TA98 preculture solution were added to 50 μ l of activated Trp P-2 prepared in accordance with the following method of Hayatsu, et al. The blended liquid was immediately incubated for 20 min at 37°C, then 2 ml of soft agar solution containing 0.5 mM histidine and 0.5 mM biotin were added thereto, and spread on a small amount of glucose agar medium. After still culturing for 48 hrs at 37°C, the number of colonies on the plate were counted. The results are shown in Table 2.

Preparation of activated Trp P-2 [method of Hayatsu, et al.: *Biochemical and Biophysical Research Communications (Biochem. Biophys. Res. Commun.)*, Vol. 92, pp. 662-668 (1980)]: 500 μ l of the aforesaid S-9 mix was added to 50 ml of Trp P-2, and this liquid mixture was immediately incubated for 20 min at 37°C. Next, an equal amount of acetone was added thereto, ice cooling was performed, and after 15 min centrifugal treatment was performed at 3000 rpm for 10 min, the supernatant obtained was vacuum dried, 50 μ l of sterilized water was added, and activated Trp P-2 was prepared.

Table 2

Additive amount (mg/plate)	Catechin	Dimeric PC	Tetrameric PC
	A (Y%)	A (Y%)	A (Y%)
0	1373 (0)	1373 (0)	1373 (0)
125	610 (57)	305 (79)	204 (87)
250	377 (75)	77 (96)	69 (97)
500	53 (98)	49 (98)	46 (98)

*Natural reversion colony number/plate: 22

From Table 2 it can be seen that the mutagenicity inhibition ratio of the proanthocyanidin oligomer with regard to activated Trp P-2 was clearly manifested and was dramatically higher than that of catechin.

From the foregoing it can be concluded that proanthocyanidin oligomers are superior as antimutagenic agents, and also have a clearly stronger action than catechin, which is already known to have antimutagenic action against benzo[a]pyrene.

Patent Applicant: Kikkoman Corp.

THIS PAGE BLANK (USPTO)